

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 3244 号	氏 名	田中 慧介
論文審査担当者	主査 教授	井上 富雄	
	副査 教授	飯島 毅彦	
	副査 教授	高見 正道	
(論文審査の要旨)			
論文題名「Junctional epithelial cells are supplied by putative stem cells」			
掲載雑誌名：Journal of Dental Research（投稿中）			
上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。			
本研究は、タモキシフェン誘導性に全身の細胞がランダムに 4 色に標識される遺伝子改変マウスを用いた幹子孫細胞のクローナリティーの視覚化および BrdU/EdU 二重染色と β -カテニン染色により、接合上皮細胞固有の幹細胞の存在とその動態を検索した。その結果、タモキシフェン投与 24 週で、接合上皮のすべての構成細胞が単一細胞クローンで置換され、第一臼歯周囲では平均 12.4 個のクローンで構成されていた。さらに BrdU/EdU 二重染色と β -カテニン染色の結果から、接合上皮細胞に特異的な幹/前駆細胞が外側基底板に局在し、娘細胞を接合上皮に供給することが示唆された。			
本論文の審査において、副査の飯島委員および高見委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。			
飯島委員の質問とそれらに対する回答：			
1. 単一の幹細胞で維持される組織（接合上皮）の利点を説明せよ。 (組織が損傷した際に、損傷細胞と同一の娘細胞を供給できることは単能性幹細胞の利点であると推察される。また今回の我々の研究では接合上皮幹/前駆細胞は接合上皮の外側基底板・基底層のエナメル質に最も離れた箇所が存在すると推察された。これは幹細胞が接合上皮の最下層に位置し、組織障害や、UV、放射線障害などから自身を守るためであると考えられ、幹細胞が障害を受けたらその娘細胞全てに障害が起こるという弱点を補っているものと考えられる)			
高見委員の質問とそれらに対する回答：			
1. 接合上皮の幹細胞およびそこから増殖・分化した接合上皮細胞が、エナメル質歯面への接着を維持しながらに歯冠方向に移動するメカニズムを考察せよ。 (接合上皮の中でもエナメル質に直接接する細胞を通例的に Directly Attached to Tooth 細胞（DAT 細胞）と呼んでおり多くの研究がなされた。この DAT 細胞はエナメル質への接着の他に歯冠側方向に移動するという矛盾する機能を持つことが明らかになり、細胞が移動する歯冠側部分ではインテグリン α 3 が、また細胞を蹴り上げる根尖側部分にはインテグリン β 4 が強く発現することが報告された (Sugisawa et al. J Periodontal Res 2010)。今回我々の研究では DAT 細胞を含む接合上皮の全ての細胞が単一の幹細胞由来である事を示した。我々は接合上皮幹細胞から分化ののち、エナメル質に接することで、何らかのシグナルが分泌され接着に必要な機能を獲得できると推測しているが、その機序やメカニズムは明らかでないため、今後さらなる研究が必要である)			

2. 今回の研究では全ての体細胞が4色の蛍光で標識されるシステムを使用したか、もし10色だった場合、同様の結果が得られるか。

(今回使用した Rosa26^{CreERT2/rtw} マウスは4色の蛍光で全ての体細胞が標識されるシステムである。そのため異なる色を呈する3つのクローンは確実に異なるクローンであると結論付けることができる。しかし、異なるクローンが同一色を呈する可能性も考えられる。一般的に、キメラ解析においては構成する色数を増やせば増やすほど統計的確度が上がると考えられており (Ueno & Weissman *Int J Dev Biol* 2010)、10色の場合ではその制度も飛躍的に上昇すると推察される。今回の我々の研究では実験群の匹数を各群 n = 10 にする事で定量解析の精度を維持したため、同様の結果が得られると考えた)

3. 幹細胞が増殖および接合上皮細胞に分化する場所はどこか推察せよ。

(同じ上皮組織である表皮幹細胞は真皮に接する1層の基底細胞の集団のみが細胞分裂をすることが知られている (Sugisawa, M. et al. *J Periodontal Res* 2010)。推測であるが表皮幹細胞と同様に外側基底層の基底層に存在する接合上皮幹細胞は基底層付近で分化し冠状方向及び歯軸に水平な方向に娘細胞を供給し組織を維持していると考えられる)

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 井上委員の質問とそれらに対する回答：

1. 接合上皮細胞のターンオーバーはどれくらいか。また週齢によって差はあるか。

(接合上皮の細胞集団の分裂指数をラジオオートグラフィにて算定した研究では、マウスのターンオーバーは4-6日であると報告された (Beagrie & Skougaard *Acta Odontol Scand* 1962)。接合上皮が比較的速やかにターンオーバーする組織であることは、歯の萌出、炎症性疾患・外傷の治癒において高い再生能力を有する事からも説明できる。

我々はEdUを用いて4週齢マウスと16週齢マウスの接合上皮のターンオーバーに有意差がない事を予備実験にて確認し、若齢と中間齢では差はないとした。本研究では細胞の老化に焦点を当てていないため老齢マウスのエイジングにおいては不明である。しかし、他組織では細胞の代謝が盛んな皮膚や消化管で研究が進んでおり、老化は幹細胞ニッチの機能不全による幹細胞減少や活性の変化が原因と考えられるようになってきた。臨床的には高齢者の口腔内では清掃が良好でも出血しやすく組織の脆弱化に気づくことが多いが、今後の研究を通じて細胞供給の仕組みや恒常性維持機構を解析することで、歯周組織の老化機構が明らかになれば、歯周病の予防や再生治療の新たな基盤の1つになると考えている)

2. クローンの中には複数幹細胞が存在するのではないかと。そうだとすると、分化を続ける幹細胞とそうでないものの差は何か。

(今回我々は接合上皮のみを維持する接合上皮幹細胞が存在し、それらが第一臼歯周囲でおよそ12個存在し、維持している事を示唆した。しかし、早い段階で複数の幹細胞同士で細胞競合が起り、適応度の低い細胞が敗者細胞として組織から排除された可能性は否定できない。最近、生体において恒常性の維持に細胞間のコミュニケーションが重要であることがわかってきた。この細胞間コミュニケーションを介した組織における恒常性の維持を解明することで分化を続ける幹細胞とそうでないものの差を理解することが出来ると考えた)

主査の井上委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

本論文は本学大学院学位論文(博士)審査基準を満たしており、学位論文に値すると判断した。

(主査が記載)